**甘露聚糖酶活性检验方法**

 1  原理

甘露聚糖酶水解半乳甘露聚糖，应用二硝基水杨酸分光光度计法，测定还原性甘露糖的释放量。

 2  活性单位

    1g固体酶粉（1 ml液体酶）在50℃ PH5.0的条件下，每分钟水解底物产生1μg甘露糖所需酶液的量定义为一个甘露聚糖活性单位。

 3  仪器与设备

 3.1 分光光度计（应符合GB9721的有关规定）

 3.2 恒温水浴锅

 3.3 电热鼓风干燥箱

 3.4 分析天平（感量0.1mg）

 3.5 电冰箱

 3.6 酸度计（精度±0.01pH）

 3.7 定时钟或秒表

 4   试剂和溶液（若未特别说明均为分析纯：所用水为蒸馏水或去离子水）

 4.1 醋酸－醋酸钠缓冲液（PH =5.0）

甲液：量去冰醋酸6ml，用水定容至1000ml，配成0.1M醋酸溶液。

乙液：称去8.2g醋酸钠，用水定容至1000ml，配成0.1M醋酸钠溶液。

应用液：取甲液三份，乙液七份混合，用PH计矫正至PH为5.0±0.05低温冷藏备用。

 4.2  3，5二硝基水杨酸试剂（DNS）

甲液：取酒石酸钠182g，溶于500 ml水中，再称取重蒸苯酚5 g、无水亚硫酸钠5 g溶于其中。

乙液：取氢氧化钠20.8 g溶于260 ml水中，再加入3，5二硝基水杨酸6 g。

将甲液和乙液倒入棕色试剂瓶混合，再加入240 ml水暗处放一周后使用。

 4.3  0.5%（W/V）甘露聚糖溶液

准确称取甘露聚糖（美国Sigma公司）0.5000g，溶于100ml PH 5.0醋酸－醋酸钠缓冲液中配制称0.5%甘露聚糖底物液置4℃的冰箱中备用。有效期三天。

 4.4  1%（W/V）甘露糖标准储备液

甘露糖在80℃±2℃烘箱中烘至恒重，准确称取1.0000g溶解并定溶于100ml容量瓶中，置于4℃冰箱内备用，备用期为三天，必要时加叠氮化钠防腐。

 4.4.1  甘露糖应用液

分别吸取甘露糖标准储备液，0.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00ml于50ml容量瓶中，用水定溶于刻度。

 5    分析步骤

 5.1  标准曲线的制作

按表 1规定的量，分别吸取甘露糖标准应用液、缓冲液和DNS试剂于各管中摇匀，将各管同时置于沸水浴中反应10分钟，取出后用冷水冷却至室温后，定溶于内直径为15mm的15ml刻度试管中摇匀，再用1cm比色杯，在分光光度计550nm波长处测吸光度，以甘露糖的量为横坐标，以吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，三次重复实验的均值获得线性回归方程，线性回归系数（r）应在0.9996以上方可使用（否则重新操作）。每次新配DNS试剂、更换分光光度计或更换分光光度计部件，都应重做标准曲线。

 1  甘露糖标准曲线

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 管号 | 甘露糖标准应用液 | | 醋酸－醋酸钠缓冲液（ml） | DNS试剂（ml） |
| 浓度（mg/ml） | 吸取量（ml） |
| 0 | 0 | 0.50 | 1.5 | 2.0 |
| 1 | 0.4 | 0.50 | 1.5 | 2.0 |
| 2 | 0.8 | 0.50 | 1.5 | 2.0 |
| 3 | 1.2 | 0.50 | 1.5 | 2.0 |
| 4 | 1.6 | 0.50 | 1.5 | 2.0 |
| 5 | 2.0 | 0.50 | 1.5 | 2.0 |

 5.2  样品的测定

 5.2.1 待测酶液的置备

称取2g固体酶粉，精确至0.1mg（或用2ml移液管，准确移取2ml液体酶样）用水溶解，准确稀释定溶，（使试样液与空白液的吸光度之差在0.3~0.6范围内）待测。

 5.2.2 操作步骤

取4支内直径15mm的15ml的刻度试管，分别加入稀释酶液0.5ml，取其中3支作为测定管，分别加入1.5ml  p H 5.0的0.5%甘露聚糖溶液，另一支作为空白管加入2mlDNS溶液，共同在50℃±0.5℃水浴30分钟，三支测定管分别加入2mlDNS溶液，空白管加入1.5ml  p H 5.0的0.5%甘露聚糖溶液，在沸水浴中反应10分钟，冷却后定溶至15ml，以空白管调零，在分光光度计550nn 处测吸光度。

 5.2.3  酶活的计算

酶活=  A×n×1000

0.5×30

式中：

A—   根据吸光度在标准曲线上，查得的甘露糖的量（mg）

n—    酶液的稀释倍数

1000— 由mg换算成ug的换算因子

0.5—  参与反应的酶液的量（ml）

30—  酶反应的时间（min）

 5. 3  允许误差

同一式样两次测试结果绝对差值，不超过算术平均值的10%。